

**FOOD/BEVERAGE ADDITIVE FOR IMMUNOPOTENTIATION AND METHOD FOR IMPARTING
FOOD/BEVERAGE WITH IMMUNOPOTENTIATION EFFECT**

Patent number: JP6007115
Publication date: 1994-01-18
Inventor: YAMAGUCHI YUZO; KAWADA IZUMI; TAKAHASHI TETSUYA; HOSOI YOKO; MATSUKURA YUMIKO; TAMAI HIDEKO
Applicant: TAKASAGO PERFUMERY CO LTD
Classification:
- international: A23L1/30; A23L2/38; A61K35/74; A23L1/30; A23L2/38; A61K35/66; (IPC1-7): A23L1/30; A23L2/38; A61K35/74; A61K35/78
- european:
Application number: JP19920190202 19920625
Priority number(s): JP19920190202 19920625

[Report a data error here](#)**Abstract of JP6007115**

PURPOSE:To provide an additive free from concern for side effects, excellent in macrophage-activating effect and natural killer cell-activating effect, containing, as active ingredient, a specific fermentation product. **CONSTITUTION:**This additive containing, as active ingredient, a fermentation product which can be obtained inoculating (A) *Bacillus subtilis* or analogous microbes into (B) vegetables selected from sweet potatoes, potatoes, taros (*Colocasia antiquorum*), okra and lily roots, followed by aerobic culture. This additive is added at pref. 0.1-50wt.% to a food/beverage.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-7115

(43)公開日 平成6年(1994)1月18日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 L 1/30	Z			
	B			
2/38	Z			
A 6 1 K 35/74	Z	7431-4C		
35/78	A B D G	7167-4C		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 8 頁)

(21)出願番号	特願平4-190202	(71)出願人	000169466 高砂香料工業株式会社 東京都港区高輪3丁目19番22号
(22)出願日	平成4年(1992)6月25日	(72)発明者	山口 雄三 東京都大田区蒲田5丁目36番31号 高砂香料工業株式会社総合研究所内
		(72)発明者	川田 泉 東京都大田区蒲田5丁目36番31号 高砂香料工業株式会社総合研究所内
		(72)発明者	高橋 哲也 東京都大田区蒲田5丁目36番31号 高砂香料工業株式会社総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 久保田 藤郎
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 免疫増強用飲食品添加剤および飲食品の免疫増強効果付与方法

(57)【要約】

【構成】 サツマイモ、ジャガイモ、サトイモ、ユリネおよびオクラより成る群から選ばれる野菜に、バチルス・ズブチリスまたはその近縁種の微生物を接種し、これを培養して得られる発酵物を有効成分として含有する免疫増強用飲食品添加剤並びに該添加剤を飲料または食品に添加することを特徴とする飲食品の免疫増強効果付与方法。

【効果】 本発明の免疫増強用飲食品添加剤は、高いマクロファージ活性化能およびナチュラルキラー細胞活性化能を有し、生体の免疫機能を増強させる特定の成分を含有している。そのため、これを添加した飲食品を摂取することによって、感染やストレスなどによる生体の免疫能力の低下に基づくと考えられる各種疾患を予防することができる。また、本発明の免疫増強用飲食品添加剤は、日常の食用に供されるものを利用したものであるので、副作用の心配をすることなく手軽に摂取することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サツマイモ、ジャガイモ、サトイモ、ユリネおよびオクラより成る群から選ばれる野菜に、バチルス・ズブチリスまたはその近縁種の微生物を接種し、これを培養して得られる発酵物を有効成分として含有する免疫増強用飲食品添加剤。

【請求項2】 サツマイモ、ジャガイモ、サトイモ、ユリネおよびオクラより成る群から選ばれる野菜に、バチルス・ズブチリスまたはその近縁種の微生物を接種し、これを培養して得られる発酵物を飲料または食品に添加することを特徴とする飲食品の免疫増強効果付与方法。

【請求項3】 発酵物を飲料または食品に対して0.1～50重量%の割合で添加する請求項2記載の飲食品の免疫増強効果付与方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、免疫増強用飲食品添加剤および該添加剤を飲食品に添加することを特徴とする飲食品の免疫増強効果付与方法に関し、詳しくは高いマクロファージ活性化能およびナチュラルキラー細胞活性化能を有し、生体の免疫機能を増強させる特定の成分を有効成分として含有する免疫増強用飲食品添加剤とそれを用いる飲食品の免疫増強効果付与方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生体の免疫能力の低下に基づくと考えられる各種疾患には、例えば癌、各種病原微生物感染症などがあり、これらの疾患を予防もしくは治療する目的でこれまでに種々の免疫増強剤が報告されている。例えば、癌の免疫療法剤としては、OK-432、PSK、レンチナンなどが実際に用いられており（大阪府病院薬剤師会編「医薬品要覧（第4版）」（昭和63年3月31日発行）薬業時報社、1500頁）、その他にも種々の微生物や植物から分離される多糖類の免疫増強効果が報告されている

（宮崎利夫編、「多糖の構造と生理活性」16～22頁（1990）、朝倉書店；水野卓、日本農芸化学会誌、63巻、861～865頁（1989））。しかしながら、これらの免疫増強剤は、いずれもショック症状や発熱などの重い副作用を示すなどの問題点を有している。

【0003】一方、食品の開発において、長い間、その一次機能及び二次機能、すなわち栄養的特性および嗜好的特性が研究の二分分野を形成していたが、近年になって、生理機能調節特性と呼ばれる三次機能が見出され、科学的に解明されつつある特定の疾病の予防に役立つ食品として機能性食品が注目されるようになってきた。前記のような免疫増強効果を有する機能性食品も提案されており、例えば莢膜を除去した菌体を有効成分とするもの（特開平3-244367号公報）、卵白を含有するもの（特開平3-251537号公報）、牛乳由来のシアル酸結合タンパク質を含有するもの（特開昭63-284133号公報）などが挙げられ、今後更なる研究が期待される分野となつてき

ている。

【0004】本発明の有効成分の原料であるサツマイモ、ジャガイモ、サトイモ、ユリネおよびオクラは、いずれも日常の食用に供される野菜であり、バチルス・ズブチリスまたはその近縁種の微生物も、例えば納豆菌が食品に利用されている。これらを組み合わせて利用した食品としては、熱処理した馬鈴薯（ジャガイモ）などの野菜に納豆菌を接種し、培養して消化のよい野菜素材を製造する方法（特開平4-51863号公報）、蒸煮馬鈴薯と納豆菌を培養して得られる粘液化した馬鈴薯を含有する、大豆を主原料とする植物性マヨネーズ様調味料の製造方法（特開昭52-3846号公報）、ポテトタンパク質をバチルス属微生物起源のプロテアーゼで加水分解して得られるペプチド組成物を含有する栄養組成物（特開昭64-20060号公報）が提案されている。しかし、いずれの食品においても、生体の免疫能力を増強するという報告は全く見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、日常の食用に供されるものを利用して、現在注目を浴びている機能性食品という形で、副作用の心配をすることなく、手軽にその効果を取り入れることを可能にした免疫増強用飲食品添加剤とそれを用いる飲食品の免疫増強効果付与方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決するため、本発明者らは、食品が潜在的に有していると考えられている三次機能のうち特に免疫増強効果を、微生物による発酵処理で顕在化および活性化する研究を行い、先に日常食用に供しているヤマノイモは、そのままでは免疫増強効果を示さないが、バチルス属の微生物、特にバチルス・ズブチリスを用いて発酵処理を行うことにより優れた感染防御効果を示すようになり、しかもこの効果はバチルス・ズブチリス自身が有する効果ではなく、ヤマノイモ中の成分が分解等の変化を受けたことによって生じた効果であることを見出し、この発酵物を有効成分として含有する機能性食品について特許出願を行った（特願平3-4735号）。そこで、更に多数の食品について発酵処理を行い、免疫増強効果の顕在化乃至活性化について検討を重ねた結果、サツマイモ、ジャガイモ、サトイモ、ユリネおよびオクラに、バチルス・ズブチリスまたはその近縁種の微生物を接種し、これを培養して得られる発酵物が、未処理のこれら野菜のホモジネートには認められなかった高いマクロファージ活性化能およびナチュラルキラー細胞活性化能を有し、生体の免疫能力を増強させる効果を有することを知見し、この発酵物を有効成分として含有する免疫増強用飲食品添加剤が前記課題を解決することを見出し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明はサツマイモ、ジャガイモ、サトイモ、ユリネおよびオクラより成る群から選ば

れる野菜に、バチルス・ズブチリスまたはその近縁種の微生物を接種し、これを培養して得られる発酵物を有効成分として含有する免疫増強用飲食品添加剤並びに該添加剤を飲料または食品に添加することを特徴とする飲食品の免疫増強効果付与方法を提供するものである。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明でいう免疫増強効果とは、生体の有する免疫機能を活性化させる効果だけではなく、何らかの理由で生体の免疫機能が低下している場合には、その機能を通常の状態まで回復させる効果をも含むものである。

【0009】本発明で用いるサツマイモ、ジャガイモ、サトイモ、ユリネおよびオクラは、いずれも食用として市場で入手可能なものであり、人体に対し何ら悪影響を与えないものである。サツマイモは、ヒルガオ科(Convolvulaceae)サツマイモ属(Ipomoea)の植物*I. batatas*の塊根であり、農林1号、紅農林、金時など多くの品種があるが、本発明ではいずれの品種をも用いることができる。

【0010】ジャガイモは、ナス科(Solanaceae)ナス属(*Solanum*)の植物*S. tuberosum*の塊茎であり、男爵、メイクーン、農林1号、紅丸など多くの品種があるが、本発明ではいずれの品種をも用いることができる。

【0011】サトイモは、サトイモ科(Araceae)サトイモ属(*Colocasia*)の植物*C. antiquorum*の球茎で、その品種は極めて多く、日本では赤芽、土垂、石川早生、唐芋、八つ頭などが多く栽培されており、主として芋の付き方で分類されているが、本発明ではいずれの品種をも用いることができる。

【0012】ユリネは、ユリ科(Liliaceae)ユリ属(*Lilium*)に属する植物の鱗茎であり、オニユリ(*L. lancifolium*)、コオニユリ(*L. leichtlinii*)、ヤマユリ(*L. auratum*)などより採取されるが、本発明ではいずれをも用いることができる。

【0013】オクラは、アオイ科(Malvaceae)フヨウ属(*Hibiscus*)の植物アメリカネリ(*H. esculentus*)の開花後の若い莢である。

【0014】これらの野菜は、そのまま、あるいは通常の加熱調理して摂取した場合には、本発明で目的とする免疫増強効果を示さないが、バチルス・ズブチリス(枯草菌、*Bacillus subtilis*)またはその近縁種の微生物を接種し、これを培養することによって、免疫増強効果を発現させることができる。ここでいうバチルス・ズブチリスの近縁種の微生物とは、例えばバチルス・プミルス(*B. pumilus*)、バチルス・リケニホルミス(*B. licheniformis*)などを挙げることができる。なお、従来より栄養食品として知られている納豆の製造に利用されているナットウ菌(*B. natto*)は、現在では、枯草菌と同一のものと分類されており、特に好ましい微生物として挙げることができる。

【0015】培養の方法については特に制限がないが、

具体的な方法として、例えば下記の方法を示すことができる。

①原料の野菜を平板状または角柱状に切り、浅く堆積して培養し発酵させる。

②原料の野菜をサイコロ状に切り、適当量の水を加えて攪拌しながら培養し発酵させる。

③原料の野菜を剥皮し磨碎して水を加え、不溶物を除いたものを培養し発酵させる。

④微生物を別に適当な培養基に対数増殖期の末期まで培養して菌体を集め、この培養基と同量の原料野菜と混合して培養し発酵させる。

⑤上記④と同様にして集めた菌体を冷却下で超音波などの手段を用いて破砕して菌体の抽出物を作成し、これに原料野菜を混合して発酵させる。

【0016】なお、いずれの方法においても、通常は微生物を接種し培養を行う前に殺菌処理を行う。上記①～⑤の方法において、特に③の方法では、微生物の生育に要する原料野菜の栄養分の消費を最小にすることが期待でき好ましい。また、⑤の方法では、③の理由に加えて発酵の程度を自由に制御することができるので特に好ましい。すなわち、微生物による免疫増強効果の発現はどのような反応によって達成されるのかは不明であるが、その指標の一つとしてプロテアーゼ活性を測定したところ、超音波処理菌体の抽出物のプロテアーゼ活性と、この抽出物により発現する免疫増強効果は正の相関を示すことが確認されたので、このことを利用すれば、希望する強さの免疫増強効果を得ることができる。

【0017】培養基は、培養方法によっては原料野菜または原料野菜と水以外には何も用いなくてもよいが、必要に応じて、他に市販されている一般細菌用の培養基であれば特に制限なく用いることができる。例えば、日水製薬株式会社製の乾燥ブイヨン、ハートインフュージョンブイヨン、トリブソーブイヨンなどを用いることができる。また、肉エキスをペプトンなどの成分を混合して調製したものを用いることもできる。

【0018】次に、培養を行う温度については、約20℃～40℃、特に好ましくは約30℃～35℃に調整するとよい。また、本発明で用いる微生物の生育には酸素が必要であるため、培養は好氣的条件下に行う。特に堆積培養の場合は、換気が容易であるように、堆積層を薄くし、密な充填は避けることが望ましい。液体培養の場合は、振とう、旋回あるいは通気・攪拌方式を採用することが望ましい。また、培養に要する時間は、接種する微生物の種類や量等によって異なるが、通常は約72時間～200時間とするのが好ましい。発酵反応の終了は、例えば培養液を無菌状態にしたのち、マクロファージ活性化能の発現状況により判定することができる。

【0019】得られた培養液は、加熱滅菌するか、固一液分離、例えば遠心分離、膜濾過法等によって菌体を除く。但し、加熱滅菌の場合は、本発明で用いる微生物が

芽胞菌であるために、他の一般的な微生物よりも苛酷な条件が必要であり、このような条件では褐変反応の進行、物性の変化および免疫増強効果の減弱などが起こる可能性があるため、これを避けるためには、加熱滅菌以外の方法を採用することが望ましい。また、堆積培養の場合は、菌体の除去を行わず、乾燥もしくは凍結して微生物の生育及び代謝活動を抑えてもよい。

【0020】こうして得られる発酵物は、培養の方法によって液体の場合と固体の場合があり、これをそのまま本発明の免疫増強食品に利用してもよいが、得られる発酵物が液体の場合は凍結乾燥などの手段により乾燥し、また、固体の場合は乾燥、粉碎して粉末状にして利用してもよい。

【0021】こうして得られる有効成分は、そのまま加工せずに、例えば納豆のように調味して食することもできるが、本発明では、必要に応じて食品用の公知の賦形剤、乳化剤、防腐剤、保存剤、安定化剤、甘味料、着色料、香料などを適宜配合して液状、スティック状、キューブ状、カード型、顆粒状、錠剤等の種々の形態に加工することもできる。これらの未加工品または加工品を、種々の食品への添加剤として利用することができる。例えば味噌、醤油、めんつゆなどの調味料の原料に混合する他、デザートや菓子類への添加、麺類製造時のつなぎ、ふりかけなどに利用できる。有効成分の配合量は、使用目的などを考慮して適宜決定すればよく、例えば錠剤として用いる場合は、食品全体の10～50重量%程度、味噌やめんつゆ等への添加する場合は、全体の3重量%程度、スナック等の菓子類への添加する場合は、全体の0.1～1重量%程度にするとよい。

【0022】こうして得られる本発明の免疫増強食品添加剤は、各種食品に添加して用いられるが、通常成人において、1日あたり有効成分量が約200mg～1,000mgとなるように摂取すれば、目的とする効果を期待することができる。

【0023】

【実施例】次に、本発明の有効成分の製造例および効果についての試験例を記し、次いで実施例を掲げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例中、菓子類の製造方法は、五十嵐敏夫著「洋菓子製法大全集 上、中、下、完結編」(1982)沼田書店；主婦と生活社編「料理大事典」(1977)主婦と生活社；渡辺長男編「製菓事典」(1981)朝倉書店*

*を参考にした。

【0024】〔有効成分の製造例〕

製造例1

剥皮したサトイモ（八つ頭）100gを水200gとともにホモジナイザーにかけて磨砕し、室温で1時間穏やかに攪拌した後、10,000×gで30分間遠心分離を行って不溶物を沈殿させ、得られた上清液100mlを500ml容量の坂口フラスコに入れて綿栓をし、121℃で20分間加熱殺菌を行った。これに、あらかじめ同じ組成の培養基にて30℃で24時間培養したバチルス・ズブチリスの培養液2mlを接種して、30℃で120時間振とう培養を行った。

【0025】培養終了後、培養液を5℃、13,000×gで30分間遠心分離を行って菌体を沈殿させ、得られた上清液を凍結乾燥して淡灰色の粉末0.97gを得た。このものの組成は、タンパク質26.4%，糖質18.6%であった。同様の方法で、サツマイモ（使用した品種は紅農林）、ジャガイモ（使用した品種は男爵）、ユリネおよびオクラの発酵物を得た。

【0026】〔免疫増強効果の試験例〕

試験例1；試験管内におけるマクロファージ活性化試験
マウス・マクロファージ由来の株化細胞J774.1を 1×10^5 個/mlとなるように10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI1640培地（日水製薬株式会社製）に懸濁し、細胞培養用96穴マイクロプレートに90μlずつ分注した。次いで、前記製造例で得た各発酵物および未発酵の各野菜のホモジネート（以下「未発酵物」と記載する）の2%生理食塩水溶液（試料が2重量%含有されるように生理食塩水に溶解した溶液、以下同じ。）を、同じく生理食塩水にて連続2倍段階希釈した試料溶液を用意し、順次各穴に10μlずつ加え、5%炭酸ガス培養器内で、37℃の条件で72時間培養した。培養後、J774.1の細胞の形態の変化を顕微鏡下で観察することにより、マクロファージ活性化を調べた。すなわち、試料溶液の代わりに生理食塩水を添加して培養した対照区ではJ774.1は小球形であるが、各試験区ではマクロファージが活性化され、伸長もしくは膨大などの形態の変化を生じるので、これを指標とし（A. Anemuraら；Agric. Biol. Chem., 51, pp. 2649-2656（1986）参照）、対照区と比較して形態の変化が認められた最小活性化濃度を求め、第1表に示した。

【0027】

【表1】

第 1 表

試験区	最小活性化濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
サトイモ発酵物	1.6
サトイモ未発酵物	100
サツマイモ発酵物	1.6
サツマイモ未発酵物	>200
ジャガイモ発酵物	3.2
ジャガイモ未発酵物	>200
ユリネ発酵物	12.5
ユリネ未発酵物	50
オクラ発酵物	1.6
オクラ未発酵物	>200

【0028】第1表より、各未発酵物では、J774.1に対しほとんど活性化能を有していないのに対し、本発明の免疫増強用飲食品添加剤の有効成分である発酵物は、いずれも高い活性化能を有することが明らかである。

【0029】試験例2；試験管内におけるナチュラルキラー細胞活性化試験

マウス・リンパ腫由来の株化細胞YAC-1を10%FCSを含むRPMI1640培地に培養し、この対数増殖期の細胞 1×10^5 個/mlを同上組成の培地に懸濁したものに、カルボキシフルオレセインジアセテート(CFDA)のアセトン溶液をCFDAの最終濃度が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加して、 37°C で1時間培養してYAC-1を標識した(Y. Suzukiら; J. Immunoassay, 12(1), pp. 145-157 (1991) 参照)。

【0030】一方、BALB/cマウス(6週令、雄)の脾臓を摘出し、滅菌した金網の上でほぐし、10%FCSを含むPRMI1640培地で3回洗浄した後、シャーレに入れて同上組成の培地に 37°C で2時間培養し、シャーレの壁面に付着したマクロファージ等の不要な細胞を除去し、ナチュラルキラー細胞を得た。これを、細胞数が 1×10^5 個/mlとなるように10%FCSを含むRPMI1640培地に懸濁し、得られたナチュラルキラー細胞懸濁液を24穴プレートに1.8mlずつ分注し、試験例1と同様にして用意した前記製造例で得た各発酵物及び未発酵物の各濃度試料溶液を各穴に0.2mlずつ加えて5%炭酸ガス培養器内で 37°C の*

*条件で24時間培養し、ナチュラルキラー細胞を活性化した。

【0031】活性化されたナチュラルキラー細胞懸濁液に、あらかじめCFDAで標識したYAC-1を細胞懸濁液の1/40容量の比率で加え、5%炭酸ガス培養器内で 37°C の条件で3時間培養した。培養後、 $800 \times \text{g}$ で2分間遠心分離を行って細胞を沈殿させ、上清液を蛍光光度計(励起波長490nm、測定波長530nm)で分析し、ナチュラルキラー細胞の影響を受けたYAC-1の細胞障害率を下記式により算出した。

【0032】

【数1】細胞障害率% = (実験値 - 自然遊離値) / (最大遊離値 - 自然遊離値) $\times 100$

【0033】なお、上記式において実験値とは、試料溶液で活性化したナチュラルキラー細胞により遊離した標識YAC-1の測定値であり、自然遊離値とは、ナチュラルキラー細胞懸濁液を加えずに同一条件で培養したときの遊離した標識YAC-1の測定値であり、最大遊離値とは、培養終了時の細胞懸濁液中に1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液を加えて細胞を溶解させ全ての標識YAC-1を含有せしめて測定した値である。以上の結果を第2表に示した。

【0034】

【表2】

第 2 表

試験区	試験濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	細胞障害率 (%)
サトイモ発酵物	30	30
サツマイモ発酵物	30	25
オクラ発酵物	10	35

【0035】第2表より、ナチュラルキラー細胞は、本発明の免疫増強用飲食品添加剤の有効成分である発酵物により活性化され、リンパ腫由来の株化細胞YAC-1に対

して優れた細胞障害活性を示すことが明らかである。すなわち、本発明の免疫増強用飲食品添加剤の有効成分は、高いナチュラルキラー細胞活性化能を有することが

明らかである。

【0036】試験例3；マウスを用いるインフルエンザウイルス感染試験

特定の病原菌に感染していないddy マウス（20～25g、雄）32匹を後記第3表に記載したように6群に分け、1～3群を対照群、4～6群を試験群とし、試験群には、前記製造例で得たサトイモ発酵物の1%生理食塩水溶液を0.2ml ずつインフルエンザウイルス接種の1日前から7日後まで1日1回経口投与し（1日の有効成分摂取量は2mg）、対照群には生理食塩水を0.2ml ずつ試験群と同じ投与間隔で投与した。インフルエンザウイルスは、孵化鶏卵中で増殖させたA-PR-8株を、生理食塩水で 10^3 PFU、 10^4 PFUおよび 10^5 PFUにそれぞれ希釈したものを用意*

*し、第1群および第4群には 10^3 PFU、第2群および第5群には 10^4 PFU、第3群および第6群には 10^5 PFUずつペントバルビタールナトリウム（ナカライテスク株式会社製）で麻酔したマウスに経鼻感染させた。通常の飼料で飼育を行い、投与後15日間にわたって体重を測定し、15日目の各群の生存状態を第3表に示し、対照群として第3群の日々の体重の変化および生存数の変化を図1の（A）および（B）に示し、試験群として第6群の体重の日々の変化および生存数の変化を図2の（A）および（B）に示した。

【0037】

【表3】

第3表

試験区	感染ウイルス量(PFU)	試験マウス数(匹)	15日目生存数(匹)	平均生存日数(日)
第1群(対照群)	10^3	6	0	9.8
第2群(対照群)	10^4	6	0	9.3
第3群(対照群)	10^5	5	0	8.8
第4群(試験群)	10^3	5	4	14.0
第5群(試験群)	10^4	5	3	12.8
第6群(試験群)	10^5	5	3	12.6

【0038】第3表および図1～図2より、本発明の免疫増強用食品添加剤の有効成分を投与したマウスは、インフルエンザウイルスに感染後、何も投与しなかったマウスに比べ明らかに延命しており、体重の回復も順調であることが判明した。

【0039】〔有効成分の製造例および試験例〕更に種々の培養方法により発酵物を得た例を以下に記載する。製造例2およびその試験例

剥皮し、 $5 \times 5 \times 30$ mmの角柱状に切断したサトイモ（八つ頭）200gを大型シャーレに入れて加熱滅菌した。これに、あらかじめ24時間培養したバチルス・ズブチリスの培養液5mlを接種して、 30°C で96時間培養を行った。培養終了後、培養物をそのまま凍結乾燥し、灰白色固形のサトイモ発酵物30.5gを得た。この発酵物500mgを10mlの温水で抽出し、得られた抽出物について試験例1と同様にマクロファージ活性化試験を行ったところ、最小活性化濃度は $1.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、また試験例2と同様にナチュラルキラー細胞活性化試験を行ったところ、試験濃度 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ でリンパ腫由来の株化細胞YAC-1に対する細胞障害率は20%であった。

【0040】製造例3およびその試験例

剥皮したサツマイモ（品種：紅農林）200gを約5mm立方のサイコロ状に切断し、水400mlを加えて2リットル容量のフラスコに入れ綿栓をして 121°C で20分間加熱殺菌を行った。これに、製造例1と同様のバチルス・ズブチ

リスの培養液を接種して、 30°C で120時間旋回培養（偏心＝3cm、回転数＝150r.p.m.）を行った。培養終了後、培養液を $13,000 \times g$ で30分間遠心分離を行って菌体および不溶物を沈殿させ、得られた上清液を凍結乾燥して淡黄褐色の粉末52.7gを得た。このものについて、製造例2と同様に試験したところ、マクロファージ活性化最小濃度は $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ナチュラルキラー細胞活性化は、試験濃度 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ でリンパ腫由来の株化細胞YAC-1に対する細胞障害率20%であった。

【0041】製造例4およびその試験例

剥皮したジャガイモ（品種：男爵）200gを製造例3と同様に処理して淡褐色の粉末27.4gを得た。このものについて、製造例2と同様に試験したところ、マクロファージ活性化最小濃度は $3.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ナチュラルキラー細胞活性化は、試験濃度 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ でリンパ腫由来の株化細胞YAC-1に対する細胞障害率25%であった。

【0042】製造例5およびその試験例

ブイヨン培地（日水製薬株式会社製乾燥ブイヨンを使用）1リットルを2リットル容量のフラスコに分注して滅菌し、これにバチルス・ズブチリスを接種して、 30°C で36時間旋回培養（偏心＝3cm、回転数＝150r.p.m.）を行った後、培養液を $13,000 \times g$ で30分間遠心分離を行って湿菌体13.5gを得た。一方、オクラ200gを水400mlとともにホモジナイザーにかけて磨砕し、ガーゼで濾過し、次いで遠心分離を行って緑色のやや濁った上清液52

11

0mlを得た。このうち500mlを滅菌した後、前記した湿菌体を固形のまま接種し、30℃で96時間回転培養（同上条件）した。培養終了後、培養液を13,000×gで30分間遠心分離を行って菌体および不溶物を沈殿させ、得られた上清液を凍結乾燥して緑色の粉末15.7gを得た。このものについて、試験例1と同様にマクロファージ活性化試験を行ったところ、最小活性化濃度は3.2 μg/mlであった。

【0043】製造例6およびその試験例

製造例5と同様にして得られた湿菌体13.5gを、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 50mlに懸濁し、0℃に冷却して120 W、20kHzで8分間超音波処理を行った。これを4℃、28,000×gで30分間遠心分離を行い、得られた上清液42.7mlを凍結保存した。こうして得られた粗酵素液のプロテアーゼ活性を血清アルブミンを基質として測定したところ、67,360チロシン単位/gであった。一方、ユリネ*

製造例2で得たサトイモ発酵物	500 mg
D-マンニトール	300 mg
結晶セルロース	100 mg
バレイショデンプン	60 mg
カルボキシメチルセルロースカルシウム	25 mg
タルク	10 mg
ステアリン酸マグネシウム	5 mg

全 量

【0045】実施例2

製造例5で得たオクラ発酵物を用いて、下記処方飲料を調製した。

ショ糖	10.0 g
クエン酸	0.35 g
製造例5で得たオクラ発酵物	0.50 g
シトラス系香料	0.1 ml
精製水	残部

全 量	100.0ml
-----	---------

【0046】実施例3

製造例6で得たユリネ発酵物を用いて、下記処方のスナック菓子を調製した。

小麦粉	100.0 g
脱脂粉乳	2.5 g
重曹	0.2 g
製造例6で得たユリネ発酵物	0.7 g
食塩	0.75g
バニラフレーバー	0.2 g
精製水	140.0 g

【0047】実施例4

製造例1で得たサトイモ発酵物を用いて、下記処方のウエハースを調製した。

小麦粉	100.0 g
脱脂粉乳	2.5 g

12

* 100gを水200mlとともにホモジナイザーにかけて磨砕し、遠心分離を行って透明な上清液135mlを得た。これを500ml容量のフラスコに入れて滅菌した後、前記した粗酵素液を解凍してその15mlを無菌的に添加して、30℃で振とう培養（振幅=4 cm、振とう数=150r.p.m.）を行った後、培養液を10,000×gで30分間遠心分離を行って不溶物を除き、凍結乾燥して灰白色粉末14.1gを得た。このものについて、試験例1と同様にマクロファージ活性化試験を行ったところ、最小活性化濃度は12.5 μg/mlであった。

【0044】実施例1

製造例2で得たサトイモ発酵物を用いて、下記処方の錠剤タイプの食品を調製した。すなわち、下記成分を常法に従って混和し、60メッシュの金網を通して粒度を調整した後、打錠機を用いて錠剤1個を製造した。

重曹	0.2 g
製造例1で得たサトイモ発酵物	0.7 g
食塩	0.75g
精製水	150.0 g

【0048】実施例5

製造例3で得たサツマイモ発酵物を用いて、下記処方のチーズクラッカーを調製した。

小麦粉	100.0 g
油脂	14.0 g
粉末チーズ	8.0 g
酵母エキス末	2.5 g
酵母	1.0 g
脱脂粉乳	1.0 g
製造例3で得たサツマイモ発酵物	1.0 g
食塩	1.0 g
精製水	130.0 g

【0049】実施例6

製造例4で得たジャガイモ発酵物を用いて、下記処方のポテトチップスを調製した。

乾燥ジャガイモ	100.0 g
植物性ショートニング	20.0 g
モノグリセリド	10.0 g
ブドウ糖	8.0 g
製造例4で得たジャガイモ発酵物	1.0 g
食塩	1.0 g

精製水

110.0 g

【0050】上記実施例1～6で得た飲食品は、いずれも本発明の添加剤を加えたことにより、免疫増強効果が付与乃至向上していた。

【0051】

【発明の効果】本発明の免疫増強用飲食品添加剤は、高いマクロファージ活性化能およびナチュラルキラー細胞活性化能を有し、生体の免疫機能を増強させる特定の成分を含有している。そのため、これを添加した飲食品を摂取することによって、感染やストレスなどによる生体の免疫能力の低下に基づくと考えられる各種疾患を予防することができる。また、本発明の免疫増強用飲食品添加剤は、日常の食用に供されるものを利用したものであるため、副作用の心配をすることなく手軽に摂取することができる。

*

*【図面の簡単な説明】

【図1】試験例3において、何ら試料を投与せずにインフルエンザウイルスを 10^4 PFU感染させたマウス（第3群＝対照群）の日々の体重の変化（A）および生存数の変化（B）を示す図である。

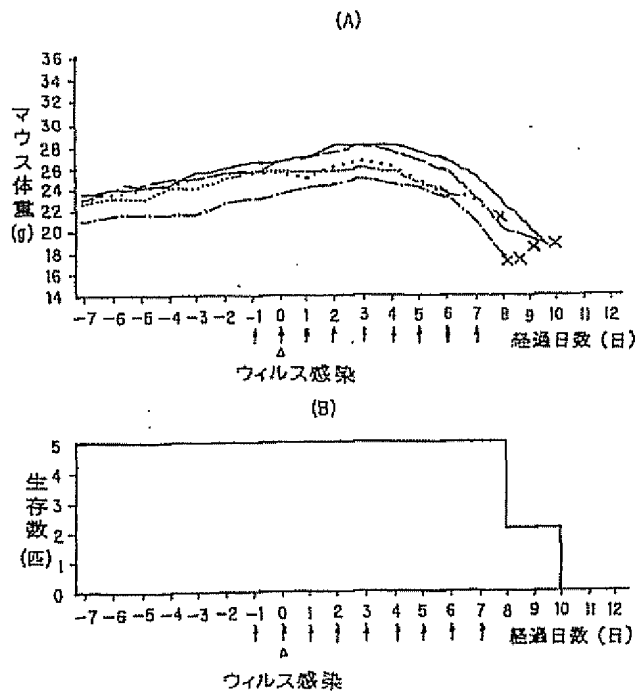
【図2】試験例3において、本発明の免疫増強用飲食品添加剤の有効成分であるサトイモ発酵物を投与してインフルエンザウイルスを 10^4 PFU感染させたマウス（第6群＝試験群）の日々の体重の変化（A）および生存数の変化（B）を示す図である。

【符号の説明】

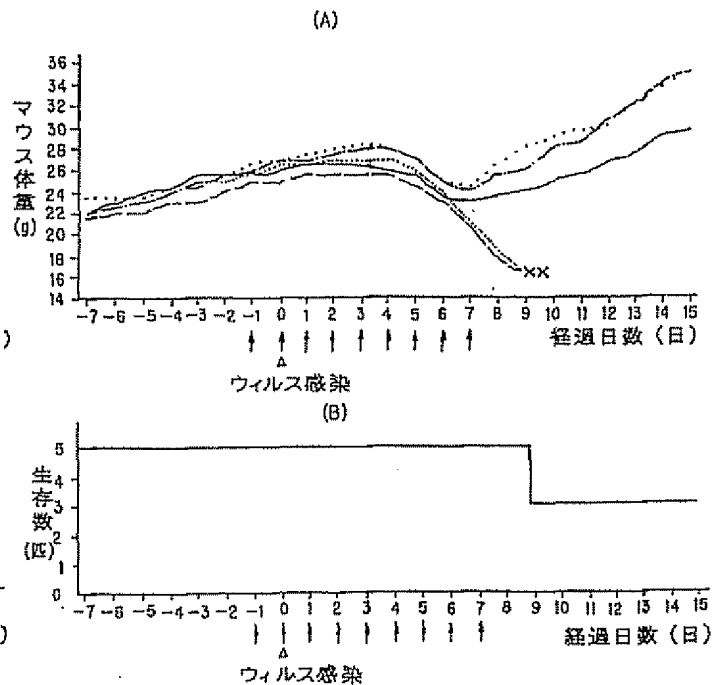
×：マウスの死亡を示す。

↑：生理食塩水（図1）またはサトイモ発酵物（図2）投与を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 細井 洋子

東京都大田区蒲田5丁目36番31号 高砂香
料工業株式会社総合研究所内

※

※(72)発明者 松倉 祐美子

東京都大田区蒲田5丁目36番31号 高砂香
料工業株式会社総合研究所内

(72)発明者 玉井 英子

東京都大田区蒲田5丁目36番31号 高砂香
料工業株式会社総合研究所内